

# **PREPARATION OF BICYCLOMYCIN**

Publication number: JP52108092 (A)

Publication date: 1977-09-10

Inventor(s): IMANAKA HIROSHI; IGUCHI HIDEKO; AOKI HATSUO \*

Applicant(s): FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO \*

Classification:

- international: C12P1/06; C12P17/18; C12R1/465; C12P1/06; C12P17/18;  
(IPC1-7): C12D9/14

- European:

Application number: JP19760025927 19760309

Priority number(s): JP19760025927 19760309

Also published as:

 JP60040838 (B)

 JP1315247 (C)

Abstract of JP 52108092 (A)

PURPOSE: Known antibiotic bicyclomycin is produced by the cultivation of a novel variation belonging to *Streptomyces* species.

.....  
Data supplied from the *espacenet* database — Worldwide

⑯ 公開特許公報 (A)

昭55—156592

① Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 12 P 1/06  
# C 12 R 1/01

識別記号

庁内整理番号  
6760—4 B

② 公開 昭和55年(1980)12月5日

発明の数 1  
審査請求 未請求

(全 7 頁)

① 抗生物質ゲンタミシンC1aの製造法

静岡県田方郡大仁町三福685

② 特 願 昭54—60021

③ 発 明 者 児玉章

④ 出 願 昭54(1979)5月15日

静岡県田方郡函南町平井1900の3

⑤ 発 明 者 藤井忠代

⑥ 発 明 者 小谷勝

三島市光ヶ丘15の4

静岡県田方郡大仁町田京727の3

⑦ 発 明 者 里井芳三

⑧ 出 願 人 東洋醸造株式会社

静岡県田方郡函南町柏谷1277の28

静岡県田方郡大仁町三福682の1

⑨ 発 明 者 武藤直紀

明 細 書

1. 発明の名称

抗生物質ゲンタミシンC1aの製造法

2. 特許請求の範囲

(1) グラクサモネラジウム属に属する抗生物質ゲンタミシンC1a生産菌を培地に培養し、その培養物より抗生物質ゲンタミシンC1aを採取することを特徴とする抗生物質ゲンタミシンC1aの製造法。

(2) グラクサモネラジウム属に属する抗生物質ゲンタミシンC1a生産菌が、グラクサモネラジウム・タイランゲンセ G 3667 である特許請求の範囲外に属する抗生物質ゲンタミシンC1aの製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、抗生物質ゲンタミシンC1a (Gentamicin C1a) の新規な製造法に関する。

従来より抗生物質ゲンタミシンC1a生産菌としては、ミクロモノスポラ・プアルレア (Micromonospora purpurea; 特公昭44—21374号、

米国特許第3091572号、Antimicrob-agents and chemother. 1965年1, 6, 14, 17および

11頁)、ミクロモノスポラ・エチノスポラ

(Micromonospora echinospora) およびその2変種 (上記同一文献)、ミクロモノスポラ・ラギ

エンス (Micromonospora ragimensis) および

その2変種 (特公昭49—42088号)、および

ミクロモノスポラ・プアルレア・バリエータ・ミ

グレットネン (Micromonospora purpurea var.

microscopa; ハンカリー菌特許第18778号、

J. Antibiot. 30: 945 (1977) が知られて

いた。上記の通り、抗生物質ゲンタミシンC1a

生産菌は、すべてミクロモノスポラ属 (Micro-

monospora) に属するものであり、その形態的特

徴は菌糸系に一個づつ胞子を形成するものであ

り、さらにミクロモノスポラ属はミクロモノス

ポラ科 (Micromonosporaceae) に属するものであ

った (Bergey's manual of determinative bacteriology

第9版 (1974))。

本発明者らは、静岡県富士市の市土農より分離

— 2 —

した放線菌は3と47株が抗生物質ゲンタシンGentamicinを産生することを見出し、返送する通り、放線菌属の2と7株がダクタロキスロランジウム属(*Dactylosporangium*)に属するもので、その形質の特性は基性菌糸に胞子のうを発生し、胞子のうの中に嚢子を有する胞子を形成するもので、さらにこのダクタロキスロランジウム属はアタラノアネス類(*Acridinopneumae*)に属するもので、従来のミクロモノスガ属とは分類学上、明らかに科の段階での相違が認められるもので、抗生物質ゲンタシンGentamicinの産能を発生であることを見出した。

また上記の放學後367校の進学状況は以下の通りである。

## (1) 形體的性狀

リング部カルシウム寒天培地: *Bact. Rev.* 21  
: 1 (1957) 丁上、3 頁、3-7 日間培養  
し、観察した結果は次の通りである。

寄生菌糸は菌絲狀または屈曲狀で、分枝をなし、  
て伸長し、分断せず、菌絲0.5~0.8  $\mu$ であり、

気菌糸は形成しない。

菌糸菌糸は、大きき  $1.5 \sim 2.0 \times 2.5 \mu$  の球状または楕円状物体の着生が、寒天培地中に随つた状態で見られる。

芽生菌糸より弱かに胞子のう柄を生じ、胞子のうは球形で、寒天培地表面に、1個または数個に形成する。胞子のうの大きさは、 $1.0 \sim 1.5 \times 4.0 \sim 6.5 \mu$ で、中に3~4個の胞子が含まれて1個に入っている。

胞子は水中で運動性があり、形は球形、楕円形または梨形を呈し、大きさは $1.0 \sim 1.5 \times 1.5 \sim 2.5 \mu$ であり、傘状で扇状の鞭毛を有している。

## 〔Ⅱ〕 ノアミノゼタリンの合成

食餌体分析によるジアミノピコリン酸は、メゾ…型およびメゾ…型より  $m$  倍の低いもの (arom. meso-ving. diaminopicollic acid) が検出された。

〔圖〕 各種輪船の合計の生産状況等

各種培地上で、50℃、14日間培養し、粗製した所見は次表の通りであり、オート・ミール類天培地上で未熟育の気菌糸がわずかに形成される。

以外は、繫帯系の形態は認められず、また孢子の  
 うはリンゴ酸カルシウム寒天培地上で良好、土菌  
 寒天培地(Japan Microbio. 5.0) : 2.95 (1.9  
 6.8) 上で、中環帯であり、その他の培地上で  
 認めずか、またほとんど形成されなかつた。

なか、色の表示は、カラー・ハーモニー・マニュアル (Color Harmony Manual) 第4版 (1958年、Container Corporation of America) による。他の分類と違つたものである。

## 各種植物上に於ける生育状態

場 所	生 育	着 生 菌 糸 の 色	可 容 性 色 素
シコクローヌ・樹膠培養大培地 (ワタスマン培地No.1) 葉	中程度ないし不良	アズリコト[Apricot (45a)]ないしダスター・オレンジ [Daster Orange (45c)]	な し
グルコー・アス・ワシオン樹天培地 (ワタスマン培地No.2) 葉	不 良	グライ・メロン・イエロー [Bright Melon Yellow (35a)]ないしアズリコト (45a)	"
グ・マリ・アス・ワシオン樹天培地 (ISP培地5) 葉	僅少ないし不良	黄色ないしグライ・メロン・イエロー [Light Melon Yellow (35a)]	"
スター・樹膠培養天培地 (ISP培地4) 葉	中程度ないし良好	ルセツ・オレンジ [Russet Orange (45e)]ないし ダスター・オレンジ (45c)	"
ナシ・樹天培地 (ISP培地7) 葉	僅少ないし不良	アズリコト [Apricot (45a)]ないしパー・パステル オレンジ [Pale Pastel Orange (45e)]	"
オート・ミール樹天培地 (ISP培地5) 葉	中程度ないし良好	オレンジ・ルセツ [Orange Rust (45e)]ないし ルセツ・オレンジ [Russet Orange (45c)]	"
イースト・ミール・樹天培地 (ISP培地2) 葉	"	メイプル [Maple (45e)]ないし、ラグジュ・タン [Luggage Tan (45e)]	メイプル (45e)ないしグライ・ ブラウン [Light Brown (45g)]
リンゴ・樹天培地	不 良	無 色	な し
樹天培地 (ワタスマン培地No.14) 葉	僅 少	"	"

- 6 -

ベネクト・樹天培地 (ワタスマン培地No.30) 葉	中程度ないし良好	メイプル (45e)ないしラグジュ・タン (45e)	メイプル (45e)ないしグライ・ブラウン (45g)
エー・ノ・樹天培地 (ワタスマン培地No.28) 葉	中 程 度	パステル・オレンジ (45e)ないしメイプル (45e)	メイプル (45e)
ハイ・キー・ト・樹天培地 (ワタスマン培地No.52) 葉	中程度ないし良好	シナモン [Cinnamon (51e)]ないしメイプル (45e)	メイプル (45e)ないしグライ・スパイス ・ブラウン [Light Spice Brown (45g)]
グルコー・アス・ワシオン樹天培地 (ワタスマン培地No.29) 葉	中 程 度	メロン・イエロー [Melon Yellow (35a)]	な し
バグ・ト・イースト・エー・ノ・樹天培地 (ISP培地6) 葉	僅 少	無 色	"
ナシ・樹天培地	僅少ないし不良	"	"
ジャガイモ片 (ワタスマン培地No.40) 葉	中 程 度	タイレルズ [Tiller Head (53a)]ないしコッパー [Copper (52e)]	"
メカイモ片・樹天培地	"	"	"
エンゲル片	僅 少	無 色	"

著 Wakumoto, S. A. The Actinomyces 1961 p. 327-334 Williams & Wilkins co.  
 参 照 Inter. J. Synt. Bact., 14: 515-540 (1966)  
 参 照 Antimicrob. Agents and Chemother. 1965 p. 116-124

- 7 -

〔Ⅳ〕生理的性

生理的諸性は下記の通りである。

1) 炭素源の消化性

炭素源	P & G 系	シロ 培養
D-アラビノース	+	+
L-アラビノース	+	+
D-フラクトース	+	+
D-ガラクトース	+	+
D-グルコース	+	+
グリセロール	—	—
L-イノシトール	—	—
D-マンノース	+	+
D-マンニトール	+	+
α-ノリビオース	+	+
β-ラクトース	+	+
ゼラチン	—	—
D-トレハロース	+	+
D-セロビオース	+	+
メレジトース	+	+
ラフィノース	+	—

— 8 —

4) メラニン色素の生成：陰性（チロシンおよび  
β-ペプトン・イーストエキスを除き大培地上）

5) スターチの加水分解：陽性

6) セルロースの分解：陽性

7) カゼインの分解：陽性

8) チロシンの分解：陽性

9) セラチンの加水分解：陽性

10) 還元水素の生成：弱い陽性

11) 硝酸塩の還元：陽性

12) 生育pH：pH 5.5～7.8

上記の通り、本菌G367の特性としては、寄生菌糸に菌形の胞子のうを産生し、胞子のう中に胞子がたてに一列にならび、胞子に棒状の鞭毛を有していることにある。

このように、胞子のうを形成し、その中に鞭毛を有する胞子を形成するものは、アクチノプラズマ科（Actinophabaceae）に属するものであつて、胞子のうが棒形で、その中にたてに一列に胞子が形成されるものは、ダクトロスポランジウム属に属する。

— 10 —

特開昭55-156592(4)

L-ラムノース	+	+
D-リボース	—	—
L-ソルボース	—	—
D-ソルビトール	—	—
シクロロース	+	+
D-キシロース	+	+
アディクトール	—	—
ゼラチン	土へ+	土へ+
スターチ	+	+
マルトース	+	+
デキストリン	—	+
イヌリン	—	—

+: 陽性、土: 試験性、—: 陰性

※: プリドハム・ゴツトリープの無菌培養

参照: Inter. J. Syst. Bact., 21: 240—247 (1971) によるルエドマンの有菌地知

2) 生育温度範囲: 20～40℃

3) 脱脂牛乳: β-ペプトン化および凝固とともに陽性

— 9 —

さらに、本菌G367株は有菌培地上で、寄生菌糸が褐色を呈し、褐色の可溶性色素を生ずる特徴を有することより、ダクトロスポランジウム・タイランゲンセ（*Ooketylloporangium thailandense*）[Arch. Microbiol., 58: 42—52 (1967)]に属するものと決定した。

よつて、本菌G367を、ダクトロスポランジウム・タイランゲンセG367と命名したもので、また本菌は工業技術院微生物工学研究所に「申請書受理番号第4840号」として申請されている。

本発明は上記の知見に基づいて発明されたもので、ダクトロスポランジウム属に属する抗生物質ゲンタミシンC1a生産菌を増殖に培養し、その培養物より抗生物質ゲンタミシンC1aを採取することとを特徴とする抗生物質ゲンタミシンC1aの製造法である。

まず本発明を実施するに最も使用されるダクトロスポランジウム属に属する抗生物質ゲンタミシンC1a（以下単に、ゲンタミシンC1aという）の

— 11 —

生産菌としては、上記のダクタロスポランジウム・タイランゲンセ 5367 株がその一例として挙げられるもので、また本発明の使用菌はこれに限定されるものでなく、ダクタロスポランジウム属に属するゲンタミシンC1a生産菌であればよく、天然または変異株も使用し得る。

次いで、本発明のゲンタミシンC1aを製造するに当つて例示すれば、上記のダクタロスポランジウム属に属するゲンタミシンC1a生産菌を通常の微生物の培養に使用する培地成分を含む培地にて好発的に培養することによつて得られる。培地としては、固形培地または液体培地が用いられるが、特に大量生産のためには液体培地、特に水溶性培地が適当である。

培地の培養成分としては、微生物の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては同化可能な炭素化合物であればよく、例えばグルコース、シクロトキシ、マルトース、スターチ、ゲキストリン、セラッソなどが使用される。窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、

— 12 —

例えばコーン・ステアー・リカー、大豆粉、結実粉、小麦グルテン、マブトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、アミノ酸混合物、硝酸塩などが使用される。その他、リン酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、ナトリウム、コバルト、鉄、マンガンなどの塩類が必要に応じて使用される。

培養菌は菌が生育し、ゲンタミシンC1aを生産する範囲内で適宜変更し得るが、特に好ましくは25〜35℃である。培養期間は、条件によつて多少異なるが、通常100〜200時間程度であつて、ゲンタミシンC1aが最大能力に達する期間を見計つて適当な時期に培養を終了すればよい。

このようにして得られたゲンタミシンC1a生産菌の菌体培養の培養物中において、ゲンタミシンC1aは菌体部分に大部分生産されている。

次いでこのゲンタミシンC1a生産菌の培養物からゲンタミシンC1aを採取するのであるが、ゲンタミシンC1aは水溶性の塩基性アミノ糖化合物であることを利用して分離精製を行なうことが簡便

— 13 —

である。また生産されたゲンタミシンC1aはバザルス・ズプアリスPC1219を溶媒として、通常の懸濁液法により活性区分の分離、および培養を行つたものである。

ゲンタミシンC1aの分離精製手順の一例を示すと次の通りである。すなわちゲンタミシンC1a生産菌を前述の如く培養して得られる培養物から固形部分を除去して培養液を得るのであるが、ゲンタミシンC1aがアミノ糖化合物であるためにその培養物のpHを一且酸性に調整し、これを中和してpH7にしてその相違性を導くことが好ましく、次いでこの培養液を陽イオン交換樹脂例えばアンバーライトMB3(50(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>型))のカラムにチャージせしめて洗浄せしめ、これにより活性物質を2Nアンモニア水にて溶出せしめ、さらにその溶出液を蒸留した後、そのpHを調整し、陽イオン交換樹脂例えばCM-カフアデックスC-25(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>型)のカラムにチャージせしめて吸着せしめ、0〜0.5Nの濃度塩酸をもたせたアンモニア水にて溶出せしめ、その活性成分を

— 14 —

得、これを減圧濃縮し、凍乾乾燥することによりゲンタミシンC1aの精製白色粉末を遊離塩基の態にて得られる。またこのようにして得られるゲンタミシンC1aは菌体クロマトグラフィーにてエーソポトを示すものであることが確認せし得る。次いでこのようにして得られた本発明のゲンタミシンC1aの物理化学的性状を挙げれば次の通りである。

## 分子重

449(マスマクトルより)

## 分子式

C<sub>18</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub>

## 比旋光度

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup> +96.2(C=0.5, H<sub>2</sub>O)

## ペーパークロマトグラフィー

クロロホルム：エタノール：17%アンモニア水(2:1:1) R<sub>F</sub> = 0.22プロパノール：ピリジン：酢酸：水(6:4:1:3) 上層液 R<sub>F</sub> = 0.29

色性状

— 15 —

白色粉末

上記の形状、さらにマスマスペクトルの各ピーク、核磁気共鳴スペクトルなどより、本発明により得られる化合物が、前述の天然物質のゲンタミシン C1a と同一物質であると判定された。

次にその物理的性質を挙げて具体的に説明するが、本発明はこれにより明らかと限定されるものではない。

実施例 1

アギストリン 1 剤、グルコース 5 剤、カゼイン水懸液 0.5 剤、酵母エキス 0.5 剤、炭酸カルシウム 0.1 剤を含有する培地 (PH 7.2: 1100 ml) を 500 ml 容び瓶内フラスコに分装し、120°C、20 分加熱殺菌した。本培地 10 本に、各 4 g のチロシン、グリコーリン、タイロタン、3.67 剤の無菌培養液よりの一包金耳を接種し、30°C、120 時間培養した。次いでこれを上記と同一組成の加熱殺菌した培地 20 l を含有する 50 l 容ジャーファーマンターに接種し、30°C、72 時間、500 rpm、毎分 20 l の無菌空気を

- 15 -

特開 55-15692(6)

条件下で通気培養増殖した。次いでアギストリン 5 剤、グルコース 0.5 剤、炭酸カルシウム 0.1 剤、酵母エキス 0.5 剤、炭酸カルシウム 0.7 剤、緩化コバルト 1.5 ppm を含有する加熱殺菌した培地 (PH 7.2) 200 l を含有する 250 l 容タンクに上記の培養液 10 l を移植し、30°C、120 時間、250 rpm、毎分 100 l の無菌空気の条件下で通気培養増殖し、培養液約 190 l を得た。

次いで、実施例 2 の如くして、その培養液よりゲンタミシン C1a を分離精製するものである。

実施例 2

実施例 1 で得られた培養液を、12 N 炭酸水溶液にて PH 2 に調整し、30 分間攪拌した後、過アンモニア水にて PH 7.0 に調整し、さらにこれに昇溶剤としてベンゾイル (商品名) 4 剤を加えて溶解し、次いで得られた培養液を、アンバライト IRC-50 (ユーム・アンド・ハース社製) (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 型) 10 l を充填したカラムにチャージし、水洗した後、2 N アンモニア水 20 l にて溶出せしめ、その全溶出液を得て、これを

- 17 -

150 ml で減圧濃縮した。

次いでこの濃縮液を 6 N 炭酸水溶液にて PH 7.0 に調整し、これを、CM-セファデックス R-25 (フアルマ・ファイン・ケミカル社製) (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 型) 500 ml を充填したカラム (φ 4 cm) にチャージして該混合物を吸出ししめた。その後該カラムを水洗後、0~0.5 N の濃度勾配をもたせたアンモニア水 5 l により溶出せしめ、溶出液を 20 ml ずつ分画した。各分画について、クロロホルム:メタノール:2 剤アンモニア水 1:1:1 の下層を無菌ろ過したろ過液をオートグラフィーを行ない、コンヒドリン染色により目的物を検出した。その結果、第 255 画分より 245 画分がゲンタミシン C1a のみを含有したものであった。次いでこの画分を回収、併せて減圧濃縮し、次いで蒸留乾燥してゲンタミシン C1a B5 型を得た。

特許出願人 東洋薬造株式会社  
代表者 伊東富士馬

- 18 -

手 続 換 正 書

昭和 55 年 10 月 8 日

特許庁長官 川 原 隆 雄 殿

1. 事件の名称

昭和 54 年特許第 6002 / 号

2. 発明の名称

「炭水化合物ゲンタミシン C1a の製造法」

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 神奈川県大田区大田 6-3-2 の 1

名称 東洋薬造株式会社

代表者 伊 東 富 士 馬

4. 補正命令の日付

昭和 55 年

5. 補正の月条

明細書の発明の詳細な説明の欄

6. 補正の内容

明細書第 4 頁第 16 行の

「diaminopimellic」を

「diaminopimellic」と訂正する



図第 18 頁第 3 行の

「セリアデンスロ」を

「セリアデラクスロ」と訂正する